

氏名 ならい しょうた 奈良井 省太  
学位 博士 (歯学)  
学位記番号 新大院博 (歯) 第 56 号  
学位授与の日付 平成 18 年 3 月 23 日  
学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当  
博士論文名

p53 affects the developmental anomaly of clefts of the palate  
in irradiated mouse embryos, but not clefts of the lip with or without the palate  
(放射線照射下において p53 遺伝子は口蓋裂発生に寄与する)

論文審査委員 主査 教授 高木 律男  
副査 教授 齊藤 力  
教授 前田 健康

#### 博士論文の要旨

口唇口蓋裂は先天異常のうちで発生率の最も高い外表奇形の一つである。発生率はおよそ 700 人に 1 人の割合で、その半分が症候群や他の奇形を伴わない症例であり、発生原因は遺伝要因と環境要因の相互作用とされている。また、唇裂を伴う口唇口蓋裂 (CL/P) と口蓋裂単独 (CPO) は発生機序が異なるとされているが、その詳細については不明な点が多い。遺伝子要因に関するこれまでの研究の中には、TGFA、MSX1、BMP4 など口唇および口蓋形成に重要な遺伝子について、これらの遺伝子欠損マウスでの表現型の一つとして口唇・口蓋裂を発生することが知られている。

一方、DNA 損傷を引き起こす電離放射線照射では、口唇・口蓋裂発生が誘発されるという報告がある。これに対し、p53 がん抑制遺伝子は修復不能の DNA 損傷をもつ細胞が発生初期の胎児に生じると、アポトーシスを誘導し奇形の発生を防ぐことが知られている。しかし、放射線照射による DNA 損傷に対して働く p53 遺伝子と口唇口蓋裂発生関連性についての報告はまだない。そこで、口唇口蓋裂自然発生系統マウスに、欠損 p53 遺伝子を導入したマウスを作成し、その口唇口蓋裂発生への影響を検討した。この CL/Fr 系マウスは、他の奇形を伴わない口唇口蓋裂自然発生系統として古くから用いられている。

#### 方法および結果

まず CL/Fr 系統と p53<sup>+/-</sup>BALB/c 系統との間で交配し、スピードコンジェニック法を用いて p53<sup>+/-</sup>CL/Fr 系統を作製した。次に、p53<sup>+/-</sup>CL/Fr 系統同士を交配させ、胎生 18.5 日の胎仔の p53 遺伝子型と口唇口蓋裂自然発生率との相関を調べたところ、CL/P の発生率は p53<sup>+/+</sup>: 16%、p53<sup>+/-</sup>: 24%、p53<sup>-/-</sup>: 13%であり、それぞれにおいて有意な差は認められなかった。また CPO は認められなかった。この結果は、DNA 損傷を誘引する特別な要因が無い環境では、p53 遺伝子が口唇口蓋裂自然発生に影響しないこと示唆した。

そこで、環境要因の変化がどのように口唇口蓋裂発生に関与するかを評価するために、器官形成期である胎生 9.5 日に  $\gamma$  線照射を 2Gy(1Gy/min)行った。その結果、胎生死率(吸収胚・胎仔死)は p53<sup>+/+</sup>: 39%、p53<sup>+/-</sup>: 8%、p53<sup>-/-</sup>: 12%、平均体重は p53<sup>+/+</sup>: 0.75g、

p53<sup>+/-</sup> : 0.91g、p53<sup>-/-</sup> : 0.97g であり、胎生死率および平均体重ともに p53<sup>+/+</sup>において胎生死率の上昇、平均体重の減少が統計学的に有意な差が認められた。これは p53 遺伝子依存性の細胞周期制御やアポトーシスがその違いに影響を与えていると考えられた。さらに本題である口唇口蓋裂の発生率について検討を行ったところ、CL/P の発生率は p53<sup>+/+</sup> : 11%、p53<sup>+/-</sup> : 6%、p53<sup>-/-</sup> : 24% であり、それぞれにおいて有意な差は認められなかった。一方、CPO の発生率については p53<sup>+/+</sup> : 29%、p53<sup>+/-</sup> : 1%、p53<sup>-/-</sup> : 3% であり、p53<sup>+/+</sup>において有意に高く、p53 遺伝子依存性アポトーシスは奇形を抑制するという従来の報告と異なる結果を得た。

#### 考察

口唇は上顎突起と内側鼻突起、口蓋は左右の上顎突起の癒合により形成され、突起癒合部の正中上皮は MEE (medial edge epithelia) と呼ばれている。現在、この上皮がどのような変化をたどるかが口唇口蓋裂発生の重要な論点となっており、①上皮細胞がアポトーシスによって「細胞死」する、②上皮細胞が間葉組織への「形質変化」を行う、の2つの仮説が立てられている。①の仮説では、上皮細胞が消失し結合組織に置き換わる際にアポトーシスの働きが必須で、アポトーシスが口唇・口蓋の形成に重要な役割を果たしていると考えられている。p53 遺伝子依存性アポトーシスは種々の刺激に対して機能するが、p53<sup>-/-</sup> CL/Pr において CL/P の発生率が上昇しないことから口唇・口蓋形成時の突起癒合の際に機能するとされるアポトーシスとは異なると言える。②の仮説では胎児の形態形成に正常な細胞の増殖・分化が不可欠であることと同様に、口唇・口蓋形成時の突起癒合の際に MEE 細胞が正常に増殖・分化し、正中上皮が間葉組織に形質転換する必要があるとされている。今回の結果は放射線照射下において p53 遺伝子依存性アポトーシスが CPO の発生原因となり、さらに組織の成長をも抑制するというものであった。つまり、どの細胞かは特定できないものの、DNA 損傷を受ける環境において、p53 遺伝子が損傷を受けた口蓋形成時の突起癒合に必要な細胞 (MEE 細胞やその周囲の細胞)、あるいはもっと前段階の口蓋突起の伸長・挙上時に必要な細胞を p53 遺伝子依存性アポトーシスによって除去し、増殖・分化を阻害している可能性が示唆された。

CL/P は p53 遺伝子の有無や放射線照射による DNA 損傷のような遺伝毒性の影響をほとんど受けないのに対し、CPO はその遺伝毒性に対して反応する p53 遺伝子依存性アポトーシスが発生に強く影響していることが示唆された。したがって、従来から指摘されているように器官形成期における DNA 損傷が、確かに CPO のリスクファクターであるという結果が得られた。

#### 審査結果の要旨

口唇口蓋裂は先天異常のうちで発生率の高い外表奇形の一つで、その発生率には人種差があることが明らかであり、日本人での発生率はおよそ 700 人に 1 人の割合とされている。人種差、家族内発生などから遺伝子が関与した先天異常であることは、容易に推測できるものの、これまでの研究では明らかな遺伝子要因の指摘には至っておらず、多因子説として遺伝要因と環境要因の相互の関与があるとされている。さらに、唇裂を伴う口唇口蓋裂 (CL/P) と口蓋裂単独 (CPO) は発生機序が異なるとされているが、その詳細については不明な点が多い。これらを少しでも解明することにより、臨床的には疾患の予防につながる事が理想的であるが、現段階では、いわゆる遺伝相談として生かすことができる。その中で、環境要因として、DNA 損傷を引き起こす電離放射線照射が、口唇・口蓋裂発生を誘発されるとされている。今回の研究は特定の器官形成のための遺伝子を対象に遺伝子要因を検討するものではなく、もともと背景因子として口唇口蓋裂自然発生という遺伝要因を持つマウスを用いて、修復不能の DNA 損傷をもつ細胞が発生初期の胎児に生じると、アポトーシスを誘導し奇形の発生を防ぐことが報告されている p53 癌抑制遺伝子の遺伝要因、環境要因に及ぼす影響を検討している点に特徴がある。

まず CL/Fr 系統と p53<sup>+/-</sup>BALB/c 系統との間で交配し、スピードコンジェニック法を用いて p53<sup>+/-</sup>CL/Fr 系統を作製した。作成した p53<sup>+/-</sup>CL/Fr 系統同士を交配させ、胎生 18.5 日の胎仔の p53 遺伝子型と口唇口蓋裂自然発生率との相関を調べたところ、CL/P の発生率は p53 遺伝子型と相関が認められなかった。この結果は、DNA 損傷を誘引する特別な要因が無い環境では、p53 遺伝子が口唇口蓋裂自然発生に影響しないこと示唆する新しい所見である。

次に、環境要因の変化がどのように口唇口蓋裂発生に関与するかを評価するために、器官形成期である胎生 9.5 日に  $\gamma$  線照射を 2Gy(1Gy/min)行った。その結果、胎生死率および平均体重ともに p53<sup>+/-</sup>において胎生死率の上昇、平均体重の減少が統計学的に有意な差として認められた。唇顎口蓋裂の発生については、CL/P の発生率に有意な差は認めなかったのに対し、一方、CPO の発生率については有意に高く、p53 遺伝子依存性アポトーシスは奇形を抑制するという従来の報告と異なる結果を得た。

口唇は上顎突起と内側鼻突起、口蓋は左右の上顎突起の癒合により形成され、突起癒合部の正中上皮は MEE(medial edge epithelia)と呼ばれている。現在、この上皮がどのような変化をたどるかが口唇口蓋裂発生の重要な論点となっており、①上皮細胞がアポトーシスによって「細胞死」する、②上皮細胞が間葉組織への「形質変化」を行う、の 2 つの仮説が立てられている。①の仮説では、上皮細胞が消失し結合組織に置き換わる際にアポトーシスの働きが必須で、アポトーシスが口唇・口蓋の形成に重要な役割を果たしているとされている。p53 遺伝子依存性アポトーシスは種々の刺激に対して機能するが、p53<sup>-/-</sup>CL/Fr において CL/P の発生率が上昇しないことから口唇・口蓋形成時の突起癒合の際に機能するとされるアポトーシスとは異なると言える。②の仮説では胎児の形態形成に正常な細胞の増殖・分化が不可欠であることと同様に、口唇・口蓋形成時の突起癒合の際に MEE 細胞が正常に増殖・分化し、正中上皮が間葉組織に形質転換する必要があるとされている。今回の結果は放射線照射下において p53 遺伝子依存性アポトーシスが CPO の発生原因となり、さらに組織の成長をも抑制するというものであった。つまり、どの細胞かは特定できないものの、DNA 損傷を受ける環境下においては、p53 遺伝子が損傷を受けた口蓋形成時の突起癒合に必要な細胞(MEE 細胞やその周囲の細胞)、あるいはもっと前段階の口蓋突起の伸長・挙上時に必要な細胞を p53 遺伝子依存性アポトーシスによって除去し、増殖・分化を阻害している可能性が示唆された。

CL/P は p53 遺伝子の有無や放射線照射による DNA 損傷のような遺伝毒性の影響をほとんど受けないのに対し、CPO はその遺伝毒性に対して反応する p53 遺伝子依存性アポトーシスが発生に強く影響していることが示唆された。したがって、従来から指摘されているように器官形成期における DNA 損傷が、確かに CPO のリスクファクターであるという非常に興味ある結果が得られ、今後の発展性も含めて学位論文としての価値を認める。